



UNIVERSIDAD
Finis Terrae

UNIVERSIDAD FINIS TERRAE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
ESCUELA DE ODONTOLOGÍA

**DETERMINACIÓN INMUNOMORFOLÓGICA DE LA PÉRDIDA DE
INSERCIÓN PERIODONTAL EN DIENTES CON PERIODONTITIS
APICAL**

PAULINA ADASME OSSANDÓN
FABIÁN RAMÍREZ BARROS

Tesis presentada a la Facultad de Odontología de la Universidad Finis Terrae,
para optar al título de Cirujano Dentista.

Profesor Guía: Dr. Alejandro Oyarzún Droguett

Santiago, Chile
2019

DEDICATORIA, AGRADECIMIENTOS

Dedico este trabajo a mis padres, por su amor incondicional y apoyo constante. A mi esposo, por ser mi principal soporte durante todo este proceso de formación profesional. Agradezco al Dr. Alejandro Oyarzún, por su constante motivación y gran calidad docente que hizo posible llevar a cabo esta investigación. Finalmente, agradecer a mis amigas y a mis pacientes por su absoluta confianza.

Paulina.

Dedico este logro a mis padres Víctor y Lizet, a mi hermano Fernando y a mis abuelos Marina y Luis, ya que, siempre han sido mi mayor motivación para poder cumplir mis objetivos. Agradecer a mi tutor Dr. Alejandro Oyarzún Droguett, por su paciencia, cariño y su constante dedicación en este trabajo, por ende, sin su entusiasmo y compromiso, no hubiese sido posible finalizar este proyecto.

Fabián.

ÍNDICE

RESUMEN	iv
ABSTRACT	iv
INTRODUCCIÓN	¡Error! Marcador no definido.
MARCO TEÓRICO	3
HIPÓTESIS	11
OBJETIVOS.....	11
MATERIALES Y MÉTODOS	12
CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	15
RESULTADOS	16
DISCUSIÓN	28
CONCLUSIÓN	32
BIBLIOGRAFÍA	33
ANEXO	37

RESUMEN

Introducción: La pérdida de inserción periodontal ha sido profusamente estudiada en dientes extraídos para explicar la patogénesis de las Enfermedades Periodontales desde 1975. La pérdida de inserción periodontal relacionada con las periodontitis apicales de origen endodóntico no ha sido estudiada suficientemente. Se estudiará la zona perirradicular y la pérdida de inserción periodontal del tercio apical de dientes con periodontitis de origen endodóntico.

Metodología: Se analizaron 65 raíces dentarias portadoras de periodontitis apical de pacientes sanos de ambos sexos, entre 18 y 60 años de edad. Las raíces se procesaron para técnica histoquímica, histobacteriología e inmunohistoquímica de proteínas colágenas y se analizaron estereomicroscópicamente. Los especímenes fueron registrados mediante microfotografía digital. Se realizó densitometría digital de regiones de interés en toda la muestra. Los datos obtenidos fueron analizados mediante la prueba ANOVA para mediciones repetidas, considerando un nivel de significancia del 95% ($p < 0,05$).

Resultados: En los especímenes experimentales y control, el ligamento periodontal remanente fue teñido por la reacción histoquímica (rojo sirio). En los especímenes experimentales en las zonas periféricas a la salida de los conductos radiculares se detectó una menor o escasa afinidad tintorial. Al contrastar con tinción de Gram se observó biofilm periapical asociado con las zonas de menor afinidad tintorial. La reacción inmunohistoquímica (anti-colágeno tipo I) coincide con la distribución de la reacción histoquímica. La prueba de ANOVA, demostró que el valor p fue inferior a 0,05 ($p = < 0,0001$).

Conclusión: Existe pérdida de inserción periodontal en zonas periféricas a la salida de los conductos radiculares en dientes portadores de periodontitis apical de origen endodóntico.

ABSTRACT

Introduction The loss of periodontal insertion has been extensively studied in extracted teeth to explain the pathogenesis of Periodontal Diseases since 1975. The loss of periodontal insertion related to apical periodontitis of endodontic origin has not been sufficiently studied. The periradicular area and the loss of periodontal insertion of the apical third of teeth with periodontitis of endodontic origin will be study.

Methodology: Sixty-five extracted teeth's roots carrying apical periodontitis were analyzed in healthy patients of both genders, between 18 and 60 years of age. The roots were processed for histochemistry (Sirius Red), histobacteriology (Gram stain) and immunohistochemistry for collagen type-I and analyzed stereomicroscopically. Specimens were recorded by digital microphotography. Digital densitometry of regions of interest was performed throughout the sample. The obtained data were analyzed by the ANOVA test for repeated measurements, considering a significance level of 95% ($p < 0.05$).

Results: In the experimental and control specimens, the remaining periodontal ligament was stained by the histochemical reaction. In the experimental specimens, a loss of tintorial affinity was detected in the peripheral areas at the exit of the root canals. When contrasted with Gram staining, periapical biofilm was observed associated with areas of lower tintorial affinity. The immunohistochemical reaction coincides with the distribution of the histochemical reaction. The ANOVA test showed that the p-value was less than 0.05 ($p = < 0.0001$).

Conclusion: There is loss of periodontal insertion in peripheral areas at the exit of the root canals in teeth carrying apical periodontitis of endodontic origin.

INTRODUCCIÓN

Las patologías pulpares y su compromiso periapical - periodontal corresponden a una de las principales causas de pérdida de piezas dentarias por Urgencia Odontológica Ambulatoria (UOA) en Chile ⁽¹⁾. Pertenecen a un conjunto de patologías bucomáxilo-faciales, de aparición súbita, de etiología múltiple, que se manifiestan principalmente por dolor agudo y que provocan una demanda espontánea de atención, tanto en los centros de salud primaria como en los servicios de atención de nivel secundario y terciario ⁽¹⁾.

Desde una perspectiva periodontal, la pérdida de inserción inducida por la respuesta inflamatoria desencadenada por la acumulación de biofilm ha sido profusamente estudiada en dientes extraídos para explicar la patogénesis de las Enfermedades Periodontales desde el año 1975. Utilizando tinción con azul de bromofenol y microscopía estereoscópica se describió la presencia de una zona de destrucción completa o parcial de las fibras periodontales, presentes entre la zona más apical al epitelio de unión y la zona más coronal de las fibras periodontales intactas ⁽²⁾.

El principal factor etiológico para el desarrollo y la progresión de la periodontitis apical es la adhesión de un biofilm en el sistema de conductos radiculares y cemento radicular. La eliminación o reducción sustancial de microorganismos del sistema de conductos radiculares es, por lo tanto, crucial para la resolución de esta patología ⁽³⁾.

La pérdida de inserción periodontal relacionada con las periodontitis apicales de origen endodóntico, caracterizadas clínica y radiográficamente, no ha sido estudiada suficientemente. Considerando lo anterior, el modelo descrito en 1975 podría ser modificado, perfeccionado y aplicado para el estudio de la patogénesis de estas enfermedades y contribuir al conocimiento y resolución de un problema de salud importante que afecta a la población en Chile.

Considerando lo anterior el problema a investigar será: ¿Qué efecto produce la periodontitis apical de origen endodóntico sobre las fibras de colágeno tipo I del ligamento periodontal en el tercio apical de la raíz dentaria?

El objetivo de esta investigación será estudiar la morfología de la zona perirradicular y la pérdida de inserción periodontal del tercio apical de dientes con periodontitis de origen endodóntico, extraídos por mal pronóstico endodóntico y rehabilitador. Para este propósito se utilizarán técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas para microscopía estereoscópica.

MARCO TEÓRICO

Se define como periodoncio, a la organización de tejidos mineralizados y no mineralizados que rodean a la pieza dentaria cuya función principal es insertar el órgano dental al proceso alveolar de los huesos mandibular y maxilar ⁽⁴⁾.

Los tejidos que conforman el periodoncio son la encía, el ligamento periodontal, los cementos radiculares y el hueso alveolar. De estos tejidos los encargados de proporcionar el anclaje del diente al proceso alveolar son el complejo cemento – ligamento periodontal – hueso alveolar ⁽⁴⁾.

El ligamento periodontal (LP) es un tejido conectivo denso altamente vascularizado que se localiza entre el hueso alveolar y el cemento radicular y tiene un grosor aproximado de entre 100 a 400 μm , compuesto por poblaciones celulares de distinta naturaleza y matriz extracelular. El componente celular incluye células óseas, cementarias, endoteliales, neuronales y restos epiteliales de Malassez, sin embargo, el componente celular predominante es el fibroblasto, siendo responsable de la síntesis y de la remodelación de la matriz extracelular, compuesta por proteínas colágenas, proteínas no colágenas y proteoglicanos ⁽⁵⁻⁶⁾.

Las fibras de colágeno del LP están compuestas por moléculas de colágeno tipo I, III y V, que representan el 75%, 20% y 5% respectivamente y en menor porcentaje se ha detectado colágenos tipo IV, VI y XII. Las fibras de colágeno del LP se insertan en la matriz del cemento radicular y del hueso alveolar para conformar el sistema de Fibras de Sharpey, responsables de la inserción dentaria ⁽⁶⁾.

En el espesor de la matriz fibrilar del LP existen numerosas células mesenquimáticas indiferenciadas, precursoras de los fibroblastos, cementoblastos y osteoblastos en la región de inserción. Durante el desarrollo del LP, estos

fibroblastos sintetizan nueva matriz extracelular y remodelan la existente de acuerdo con la actividad funcional de la pieza dentaria ⁽⁶⁾.

Las Fibras de Sharpey proporcionan la solidez estructural al LP, compuestas principalmente de colágeno tipo I, con un aporte menor de colágeno tipo III. La mayoría de las fibras de colágeno, en la parte central del espacio periodontal, están dispuestas en haces de fibras bien definidas llamadas fibras principales. Las fibras principales se clasifican según su ubicación y orientación a lo largo de la raíz, puede subdividirse en transeptales y alveolodentales ⁽⁶⁾.

Las fibras transeptales se extienden desde el cemento radicular de un diente y atraviesan la cresta alveolar hasta el cemento radicular del diente adyacente; y las fibras alveolodentales representa la mayor parte del volumen del LP y contiene fibras de la cresta alveolar, fibras horizontales, fibras oblicuas, fibras apicales y, en el caso de los dientes de raíces múltiples, fibras interradiculares ⁽⁶⁾.

Las fibras de la cresta alveolar van desde la parte cervical de la raíz hasta la cresta ósea alveolar en dirección oblicua-apical. Apical de las fibras de la cresta alveolar, las fibras horizontales corren en dirección perpendicular desde el túmulo de cemento hasta la cresta alveolar. Las fibras oblicuas son las más numerosas LP y van desde el cemento radicular en dirección oblicua-coronal hasta el hueso alveolar. Las fibras apicales están organizadas desde el ápice de la raíz hasta la base del alvéolo. Las fibras interradiculares sólo se encuentran en dientes con varias raíces y se extienden desde el cemento radicular hasta el hueso alveolar interradicular ⁽⁶⁾.

La compleja orientación espacial de las fibras principales es esencial para la función del LP, ya que permite el soporte tridimensional, protección contra las fuerzas multidireccionales de la masticación y barrera contra la invasión bacteriana ⁽⁶⁾.

El cemento radicular (CR) es un tejido conectivo mineralizado avascular, no innervado que recubre la dentina radicular. Al igual que otras biocerámicas contiene fibras colágenas incluidas en una matriz orgánica que se biomineraliza. El contenido mineral del CR es principalmente hidroxiapatita, y su matriz orgánica fibrilar está compuesta principalmente por colágeno tipo I y III ⁽⁷⁻⁸⁾.

En el CR se insertan fibras del LP y contribuye en el proceso de reparación cuando la superficie radicular ha sido dañada. Se ha determinado morfológicamente que en un diente humano existen cuatro tipos de CR. Su morfología está dada por la presencia o ausencia de células, la presencia o ausencia de fibras colágenas y la orientación de las fibras colágenas en la matriz ⁽⁷⁻⁸⁾.

De acuerdo con lo descrito anteriormente las modalidades de CR son: cemento acelular afibrilar (CAA), cemento acelular con fibras extrínsecas (CAFE), cemento celular con fibras intrínsecas (CCFI) y cemento celular estratificado mixto (CCEM) ⁽⁸⁾. El tercio apical de la raíz está cubierto por CCFI y CCEM y son los cementos de interés endodóntico. El CCFI conforma el conducto cementario ubicado entre la constricción apical y el vértice anatómico de la raíz ⁽⁷⁻⁸⁾.

La enfermedad periodontal o periodontitis es una enfermedad infecciosa asociada con una respuesta inmunológica local inadecuada, es altamente prevalente y afecta hasta al 90% de la población mundial ⁽⁹⁾. La enfermedad periodontal afecta a uno o más de los tejidos periodontales: hueso alveolar, LP, CR y encía. La patogenia de esta enfermedad implica respuestas inmunológicas que conducen a la destrucción de tejidos y la pérdida ósea ⁽¹⁰⁾.

El LP es uno de los tejidos con mayor actividad metabólica del organismo y el metabolismo del colágeno representa la mayor parte de esa actividad. Una característica importante de los tejidos conjuntivos en general y del LP en

particular es el proceso de constante renovación de los componentes de la matriz extracelular en el que intervienen las metaloproteinasas ⁽¹¹⁾.

El biofilm periodontal genera daño y destrucción de los tejidos induciendo una respuesta inmune inflamatoria a través de la expresión de interleucina 1 (IL-1), el factor de necrosis tumoral alfa, el interferón gamma, la prostaglandina E2 y la síntesis de metaloproteinasas de la matriz (MMPs). Los niveles sistémicos y locales de estas citoquinas revelan la progresión de la destrucción del tejido. La IL-1 en sus dos formas moleculares α y β es un factor activador de los osteoclastos ⁽¹²⁾.

Se han identificado niveles elevados de IL-1 β en el fluido crevicular en adultos con enfermedad periodontal, estos niveles están relacionados con el proceso inflamatorio periodontal, la pérdida de inserción clínica y el aumento de la profundidad al sondaje. Las proteasas en el líquido crevicular muestran la actividad destructiva del tejido conectivo y aumentan según la gravedad de la enfermedad. La principal contribución fisiológica y patológica en la degradación del colágeno en el tejido gingival se le atribuye a la MMP-1, que proviene principalmente de los fibroblastos. Las MMPs son los participantes más importantes en la destrucción del tejido periodontal relacionado con la enfermedad periodontal debido a su papel en la degradación patológica de la matriz extracelular en los tejidos periodontales. Se ha informado que los niveles de MMP-1 aumentan hasta 50 veces en las personas que desarrollan la enfermedad ⁽¹²⁾.

La periodontitis apical es una enfermedad inflamatoria de los tejidos periodontales del tercio apical de la raíz de un diente, causada por la invasión microbiana del sistema de conductos radiculares ⁽¹³⁻¹⁴⁾.

En la génesis de la periodontitis apical están involucrados factores exógenos y endógenos. Entre los factores exógenos se encuentran los microorganismos (toxinas productos metabólicos), agentes químicos, irritación

mecánica, cuerpos extraños y traumatismos. Los factores endógenos están relacionados con la síntesis de citoquinas y enzimas proteolíticas propias del proceso inflamatorio ⁽¹⁵⁾.

El proceso inflamatorio que se desencadena en la región periapical impide la diseminación de bacterias y sus productos metabólicos desde el conducto radicular infectado hacia los tejidos adyacentes y hacia sitios distantes. La presencia de biofilm dentro del conducto radicular mantiene la inflamación de los tejidos periapicales en forma crónica. Esto significa que la periodontitis apical solo repara con la ejecución de un tratamiento no quirúrgico del sistema de conductos radiculares. ⁽¹⁶⁾.

La reabsorción ósea es la característica más sobresaliente de la periodontitis apical y es un efecto secundario inevitable del proceso defensivo. La pérdida ósea que se evidencia en las radiografías, es el principal indicador clínico de la presencia de periodontitis apical, ya que muchas de estas lesiones no manifiestan síntomas clínicos evidentes.

De acuerdo con la Asociación Americana de Endodoncia las periodontitis apicales son dos entidades: Periodontitis Apical Asintomática y la Periodontitis Apical Sintomática.

La Periodontitis Apical Asintomática es una inflamación y destrucción del periodoncio apical que es de origen pulpar, aparece como un área radiolúcida apical y no produce síntomas clínicos ⁽¹⁷⁾.

Periodontitis Apical Sintomática es una inflamación del periodoncio apical, que produce síntomas clínicos que incluyen una respuesta dolorosa a la mordida y/o percusión o palpación. Puede o no estar asociado con un área radiolúcida apical ⁽¹⁷⁾.

La periodontitis apical asintomática es un proceso inflamatorio periapical de larga evolución con reabsorción ósea periapical radiográficamente visible, pero sin signos ni síntomas clínicos. La periodontitis apical sintomática puede desarrollarse como consecuencia directa de la descomposición y la infección de la pulpa en una región periapical previamente sana. Las lesiones pueden surgir como resultado de un desequilibrio entre la defensa del huésped y la infección bacteriana en una lesión ya establecida. A nivel microscópico, diferentes formas estructurales de periodontitis apical pueden ser identificadas, éstas incluyen al granuloma apical, absceso apical y quiste apical ⁽¹⁶⁾.

El curso y la gravedad de la respuesta del tejido a la infección del conducto radicular dependen de la carga microbiana, el potencial de defensa del huésped y el tiempo. Las periodontitis apicales sintomáticas pueden desarrollarse en las etapas iniciales, cuando los microorganismos han aumentado rápidamente en número y han superado a la defensa inmunitaria local. Este escenario está relacionado principalmente con bacterias en su estado planctónico, lo que permite un rápido crecimiento de los organismos. Ciertos patógenos parecieran relacionarse con la agudización clínica de los procesos. Los organismos que pertenecen al segmento anaeróbico de la microbiota, incluidos los géneros de Porphyromonas, Prevotella, Fusobacterium y Peptostreptococcus, se asocian con mayor frecuencia a lesiones sintomáticas y dolorosas de periodontitis apical que a otros tipos de organismos ⁽¹⁶⁾.

La reabsorción ósea es el sello de la periodontitis apical. En las fases iniciales de la periodontitis apical, los osteoclastos son abundantes y superan a los osteoblastos formadores de hueso. En consecuencia, el resultado es la pérdida de tejido óseo dentro de un área limitada cerca de la salida del conducto radicular principal y / o conductos accesorios. Junto con el proceso de reabsorción ósea, algunas zonas apicales de la raíz también pueden reabsorberse. Sin embargo, la reabsorción de la raíz será mucho menos pronunciada y, a menudo, es visible solo en cortes microscópicas y eventualmente, en las radiografías. A veces el extremo

apical del conducto radicular se ensancha hasta el punto de que se altera la configuración original de la anatomía del foramen apical ⁽¹⁶⁾.

El colágeno es la proteína estructural más importante de los sistemas biológicos y tejidos conectivos en un vertebrado. El colágeno ha sido estudiado profusamente con técnicas bioquímicas, inmunoquímicas, histoquímicas e inmunohistoquímicas ⁽¹⁸⁾. La tinción específica de los componentes de la matriz extracelular es especialmente útil en el estudio de la remodelación de tejidos, particularmente en el caso de patologías del tejido conectivo.

La tinción de Picro-Rojo Sirio para el colágeno fue desarrollada por Puchtler y cols. (1964) y optimizado por Puchtler y cols. (1973) y Junqueira y cols. (1979). El método es una variante de la tinción de Van Gieson en la que el colágeno se colorea de rojo con ácido fucsina en presencia de ácido pícrico. El método de Van Gieson proporciona una coloración roja del colágeno, pero no de las fibras (reticulares) y membranas basales más delgadas. Todas estas estructuras están teñidas de rojo picro-sirio. Desde la década de 1980, la tinción con Rojo Sirio F3B disuelto en una solución acuosa saturada de ácido pícrico ha sido el método de elección para estudios cuantitativos, distribución de tamaño y orientación de las fibras colágenas. Algunos ejemplos de aplicaciones recientes incluyen investigaciones de cambios patológicos en el intestino, arterias cerebrales, arterias coronarias, hígado y piel ^(19,20).

La molécula de colágeno está denaturada cuando pierde su disposición cuaternaria o triple helicoidal. Un método muy utilizado para detectar morfológicamente el estado denaturado o nativo de una proteína es mediante el uso de anticuerpos policlonales y monoclonales. Diversos estudios inmunohistoquímicos en el área de la Odontología y Dermatología han utilizado estos métodos, transformándolos en una herramienta útil para estudiar la dinámica molecular, especialmente en los tejidos conectivos patológicos ⁽²¹⁻²²⁾.

Considerando la evidencia anterior, este trabajo de investigación estudiará la organización del ligamento periodontal apical en dientes extraídos y portadores de periodontitis apical, mediante técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas.

HIPÓTESIS

La periodontitis de origen endodóntico induce la pérdida de fibras de colágeno tipo I en el LP en la región apical de la raíz.

OBJETIVOS

Objetivo General:

1. Determinar la pérdida de fibras de colágeno tipo I en el LP apical en dientes portadores de periodontitis de origen endodóntico.

Objetivos Específicos:

1. Observar la organización del LP apical en dientes portadores de periodontitis de origen endodóntico.
2. Identificar epitopos de colágeno tipo I en el LP apical de dientes portadores de periodontitis de origen endodóntico.
3. Cuantificar la pérdida de fibras de colágeno en el LP apical de dientes portadores de periodontitis de origen endodóntico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de la muestra:

Se obtuvieron 65 raíces dentarias portadoras de periodontitis apical y con indicación de extracción por mal pronóstico rehabilitador, en la Clínica de Cirugía de la asignatura de Medicina Estomatológica y Clínica del Dolor I y II de la Facultad de Odontología de la Universidad Finis Terrae con previa firma del documento: “Convenio Prestación de Servicios Odontológicos”.

Criterios de inclusión y exclusión:

- Inclusión: Los especímenes se obtuvieron de pacientes de ambos sexos, de entre 18 y 60 años de edad.
- Exclusión: Pacientes comprometidos sistémicamente.

Procesamiento de los especímenes:

Las raíces dentarias o los especímenes de la muestra se fijaron en formaldehído al 10 % durante 48 horas y se almacenaron en refrigerador a 4°C.

Determinación histoquímica de proteínas colágenas:

Las raíces dentarias se tiñeron con una solución de Sirius Red F3B al 0,1% en ácido pícrico saturado durante 60 minutos a temperatura ambiente, posteriormente fueron lavadas profusamente con agua corriente.

Localización inmunohistoquímica de colágeno tipo I:

Los especímenes fijados fueron incubados en una solución de pepsina al 0,1% en ácido clorhídrico 0,1 normal a 37°C durante 60 minutos para exponer los epitopos de colágeno sobre la superficie radicular.

Las raíces dentarias fueron incubadas en una solución de peróxido de hidrógeno al 0,3% durante 3 minutos para el bloqueo de las peroxidasas endógenas. Luego de esto, fueron profusamente lavados con buffer fosfato salino (PBS) pH 7,4 durante 5 minutos.

Los sitios inespecíficos de la superficie radicular fueron bloqueados con una solución de albúmina de suero bobino (BSA) al 3% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente.

Los especímenes fueron incubados en un anticuerpo monoclonal anti-colágeno tipo I humano (Sigma, USA) diluido 1 en 100 en PBS-BSA a 4°C overnight. Los especímenes fueron lavados profusamente con PBS y la unión antígeno-anticuerpo fue detectada con el sistema biotina estreptaidina-peroxidasa (R.T.U VectaStain Kit Vector, USA).

Histobacteriología:

Los especímenes teñidos histoquímicamente e inmunohistoquímicamente fueron contrastados con tinción de Gram, para lo cual fueron incubados en una solución de cristal violeta al 1% durante 3 minutos. Inmediatamente se utilizó una solución de Lugol como mordiente y fueron lavados en 3 cambios de acetona.

Análisis Microscópico y Procesamiento de Imágenes:

Los especímenes de la muestra procesados para histoquímica, inmunohistoquímica e histobacteriología se observaron mediante microscopio estereoscópico Nikon SMZ-800 y fotografiados con una cámara digital Nikon DS-Fi. Las imágenes se guardarán como archivos JPEG.

Se analizaron densitométricamente 5 regiones de interés de 200 μm^2 en las zonas de pérdida evidente de reacción histoquímica en los ápices de todos los especímenes de la muestra mediante el software Image J (Platform for Scientific Image Analysis). Como control se analizaron zonas de LP sano del tercio cervical y medio de los mismos especímenes.

Controles:

Como control de la localización inmunohistoquímica de colágeno tipo I se utilizó la zona radicular de premolares sanos extraídos por indicación ortodóncica.

La especificidad de la inmunorreacción fue controlada omitiendo los anticuerpos primarios y reemplazándolos por PBS-BSA.

Análisis e interpretación de los datos:

Los datos obtenidos de la densitometría de las ROI, tanto de los especímenes experimentales como de los controles, fueron analizados estadísticamente mediante la prueba de ANOVA para mediciones repetidas utilizando el programa Prism Versión 8.12, considerando un nivel de significancia del 95% ($p < 0,05$).

CONSIDERACIONES ÉTICAS

Los dientes utilizados en este estudio fueron recolectados en la Clínica de Cirugía de la asignatura de Medicina Estomatológica y Clínica del Dolor I y II de la Facultad de Odontología de la Universidad Finis Terrae con previa firma del documento: “Convenio Prestación de Servicios Odontológicos”.

Una vez finalizado el anteproyecto, se obtuvo la aprobación del Comité Ético Científico de la Universidad Finis Terrae (Anexo), previo a la recopilación de la muestra.

RESULTADOS

Determinación histoquímica de proteínas colágenas

La reacción histoquímica positiva se observó en la superficie radicular de todos los especímenes, tiñendo de color rojo intenso las zonas que presentaban ligamento periodontal remanente. Estas zonas fueron denominadas como Zonas Ricas en Colágeno (ZRC). Una observación destacable fue que, en la superficie apical de la raíz, en zonas periféricas a la salida de los conductos radiculares se detectaron zonas que presentaban menor o ninguna afinidad tintorial por el colorante empleado. Estas zonas se denominaron como Zona Libre de Colágeno (ZLC) (figuras 1a, 1b, 1c, 1d, 1e y 1f).

Histobacteriología

En los especímenes procesados para histoquímica y contrastados con tinción de Gram se pudo observar poblaciones microbianas adheridas y organizadas como un biofilm a la superficie apical de la raíz (BFP), en zonas periféricas a la salida de los conductos radiculares y relacionados con las Zonas Libres de Colágeno.

Una observación destacable fue que, en todos los especímenes se evidenció diferencialmente Gram positividad en áreas de la raíz que estuvieron expuestas al medio ambiente subgingival de los dientes in vivo y en regiones periapicales. Al inspección visual se puede detectar que, la negatividad de la reacción de las Zonas Libres de Colágeno coincide con la negatividad de la reacción de las Zonas Libres de Placa (figuras 2a, 2b y 2c).

Localización inmunohistoquímica de colágeno tipo I

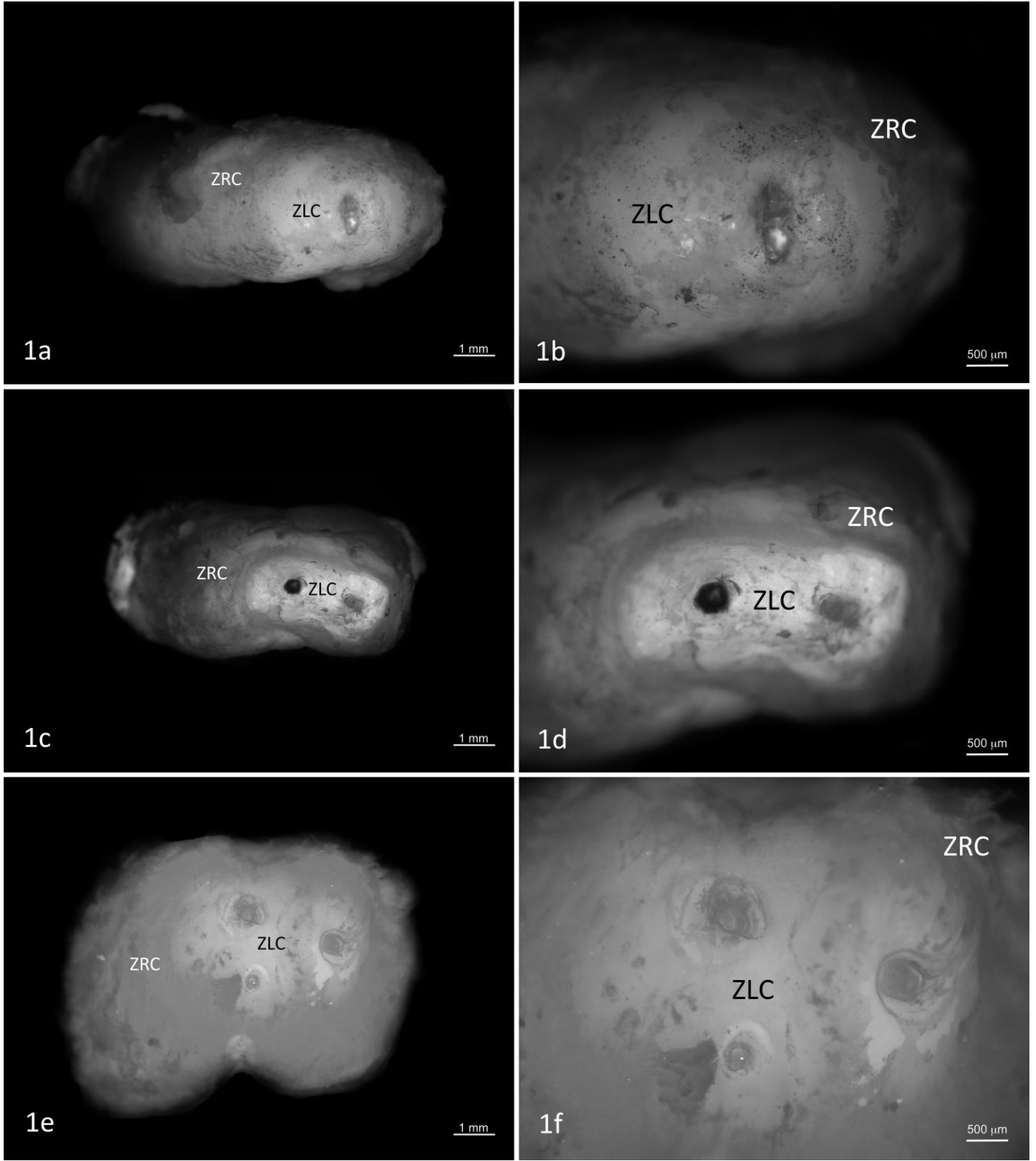
La inspección de los especímenes experimentales permitió evidenciar a la reacción antígeno – anticuerpo como una coloración de color café amarillento que se distribuye específicamente en las Zonas Ricas en Colágeno (ZRC) de las raíces dentarias. Las Zonas Libres de Colágeno (ZLC) presentaban a la inspección visual una menor o nula afinidad por la reacción antígeno – anticuerpo (figuras 3a, 3b, 3c, 3d y 3e).

En el espécimen control negativo la inmunopositividad no fue demostrada (figura 3f).

Análisis e interpretación de los datos

Los datos obtenidos del análisis densitométrico de la regiones de interés (ROI) (figura 4) en los especímenes experimentales y analizados estadísticamente mediante la prueba de ANOVA para mediciones repetidas, demostró que el valor p fue inferior a 0,05 ($p = <0,0001$). Este valor indica, que existen diferencias significativas en la intensidad de reacción histoquímica entre las ZRC y ZLC (gráfico 1).

Lámina 1



Leyenda de Figuras

Lámina 1

Figura 1a 1c y 1e

Espécimen experimental – Tinción Rojo Sirio F3B

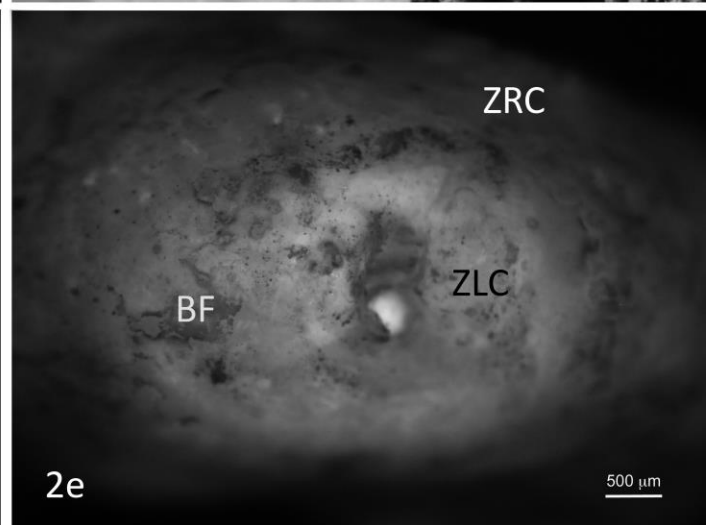
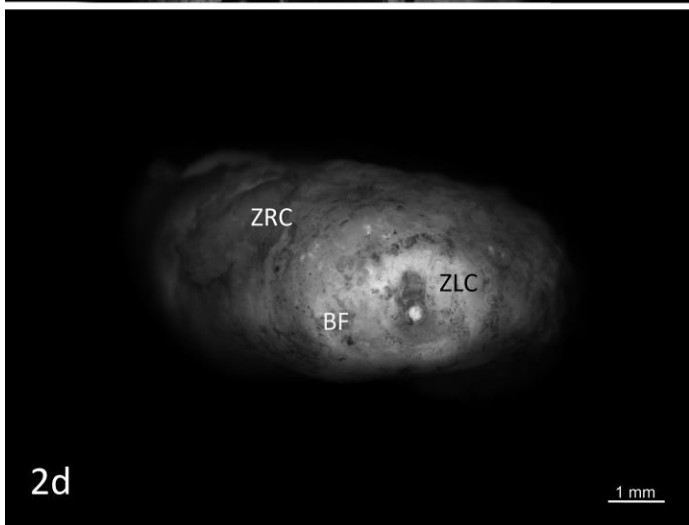
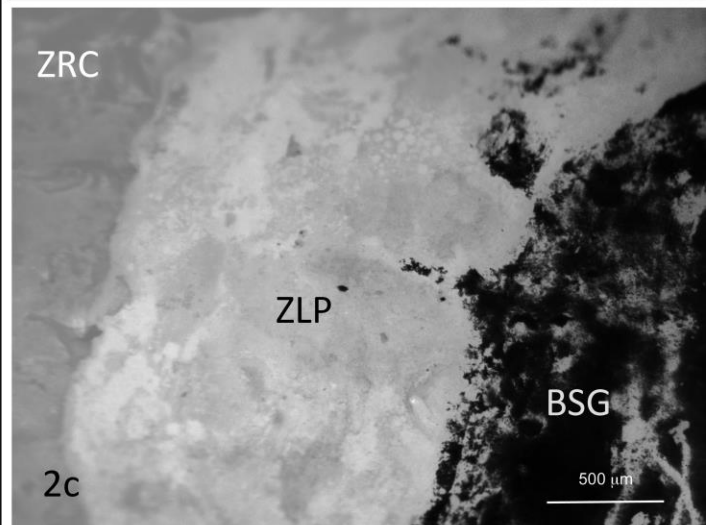
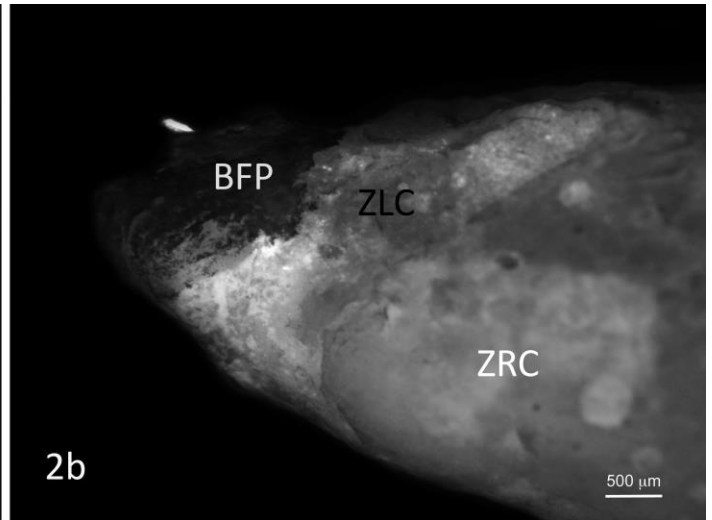
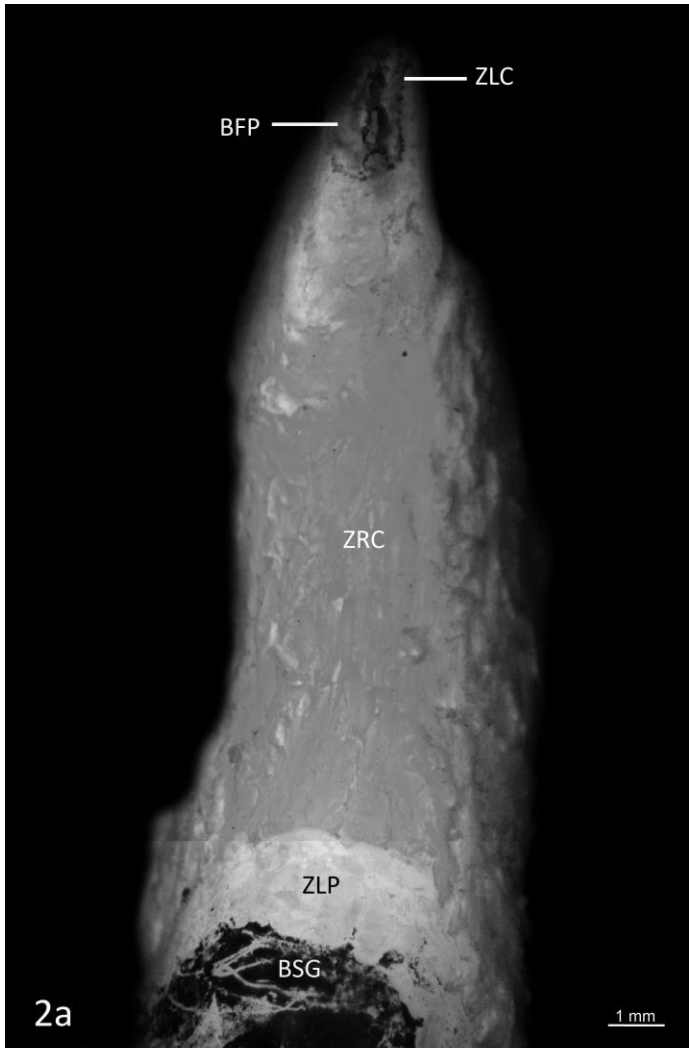
Nótese la superficie radicular cuyo ligamento periodontal remanente se observa teñido de color rojo intenso por el colorante empleado. Este ligamento periodontal remanente se denomina Zona Rica en Colágeno (ZRC). Se detecta nítidamente que el ápice radicular, cercano al foramen apical, presenta una menor afinidad tintorial por el colorante. Esta región se denomina Zona Libre de Colágeno (ZLC).

Figura 1b 1d y 1f

Espécimen experimental – Tinción Rojo Sirio F3B

Se aprecia con mayores aumentos la ZLC en el ápice radicular de los especímenes mostrados. Zona Rica en Colágeno (ZRC).

Lámina 2



Leyenda de Figuras

Lámina 2

Figura 2a

Espécimen experimental – Tinción Rojo Sirio F3B – Contraste Tinción de Gram.

Vista corono apical.

Nótese el Biofilm Subgingival (BSG) adherido a la superficie dentaria. Apical a este biofilm se detecta la Zona Libre de Placa (ZLP). La mayor parte de la superficie radicular se observa cubierta por ligamento periodontal remanente teñido de color rojo intenso por el colorante empleado (ZRC). En la región periapical se observa una zona denudada de fibras periodontales (ZLC). El contraste con tinción de Gram permite visualizar poblaciones microbianas organizadas como un biofilm (BF) adheridas a la superficie dentaria en zonas adyacentes al foramen apical.

Figura 2b

Espécimen experimental – Tinción Rojo Sirio F3B – Contraste Tinción de Gram.

Con mayor aumento se observa en la región periapical del espécimen la ZRC y la ZLC. El contraste con tinción de Gram permite visualizar poblaciones microbianas organizadas como un biofilm (BFP) adheridas a la superficie dentaria en zonas adyacentes al foramen apical.

Figura 2c

Espécimen experimental – Tinción Rojo Sirio F3B – Contraste Tinción de Gram.

Con mayor aumento se observa en la región cervical del espécimen. Se detecta con nitidez la organización del Biofilm Subgingival (BSG), la Zona Libre de Placa (ZLP) y Zona Rica en Colágeno (ZRC).

Figura 2d

Espécimen experimental – Tinción Rojo Sirio F3B – Contraste Tinción de Gram.

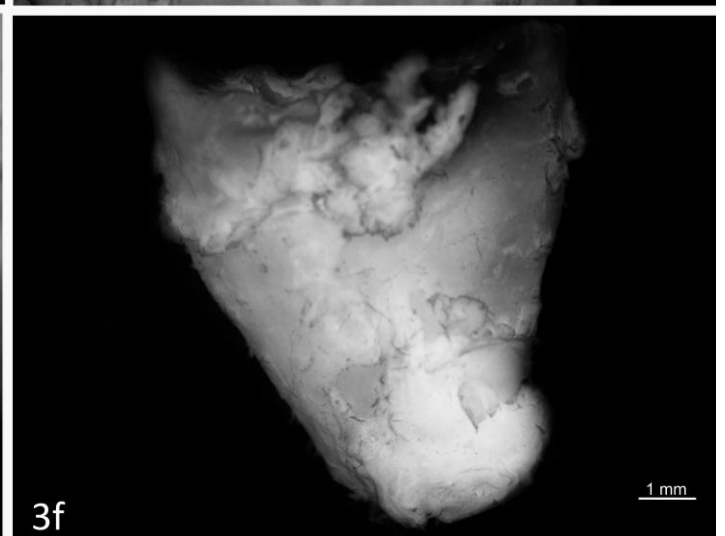
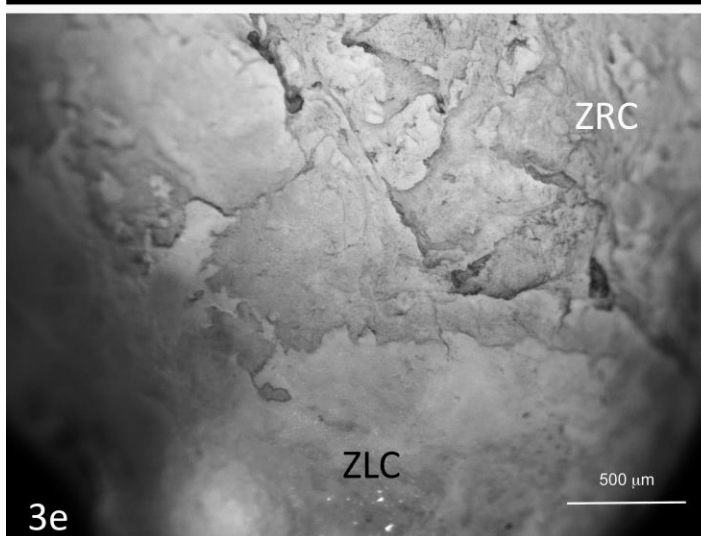
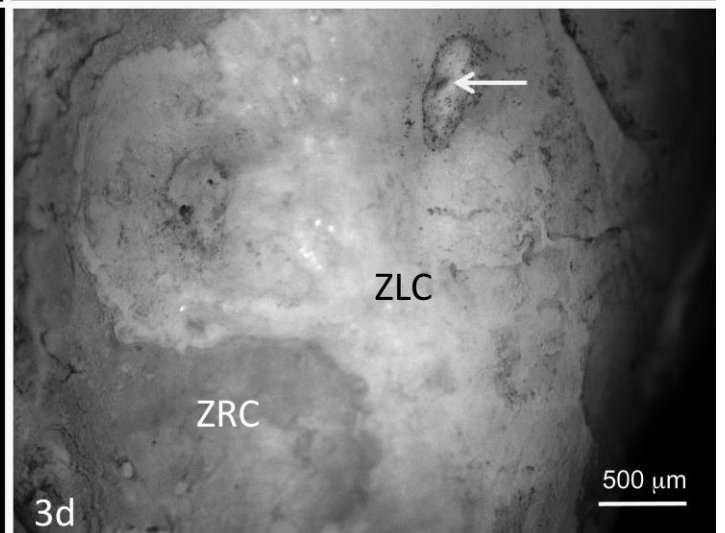
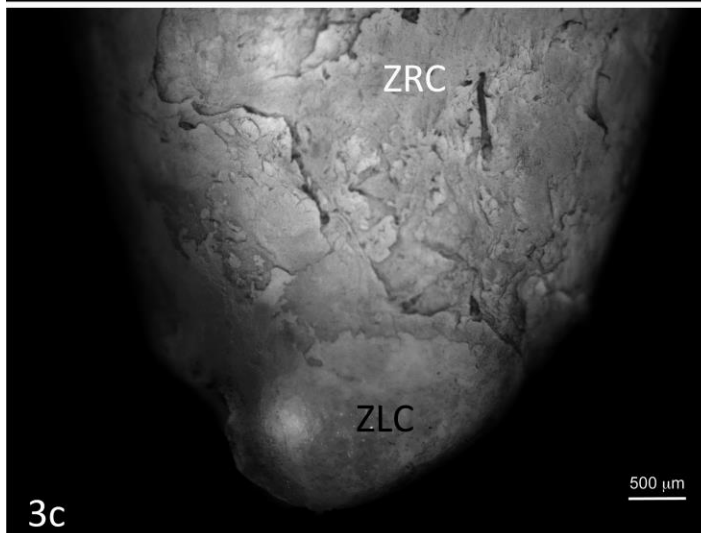
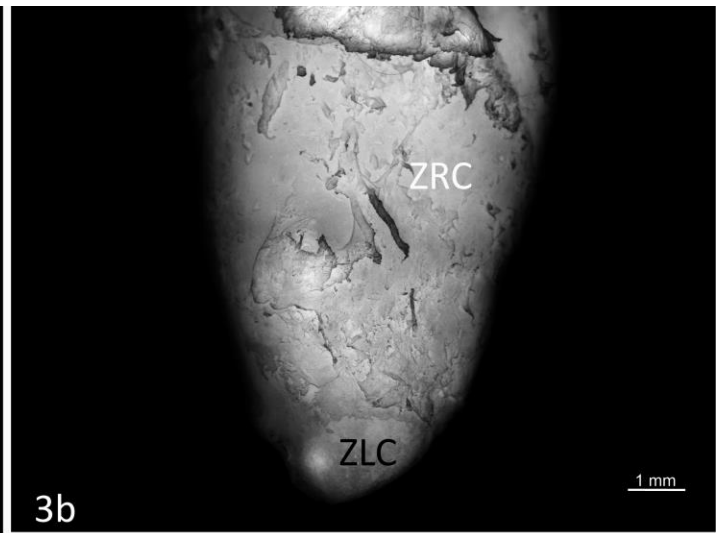
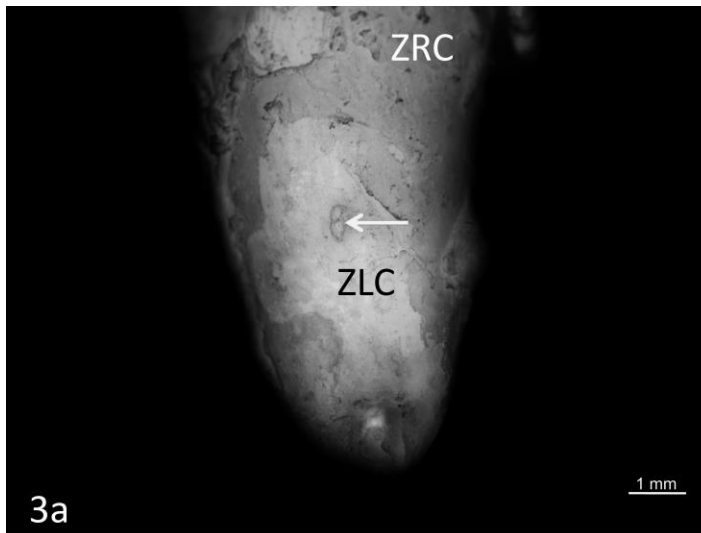
Nótese la superficie radicular cuyo ligamento periodontal remanente se observa teñido de color rojo intenso por el colorante empleado (ZRC) y la zona denudada de fibras periodontales (ZLC) . El contraste con tinción de Gram permite visualizar poblaciones microbianas organizadas como un biofilm (BF) adheridas a la superficie dentaria en zonas adyacentes al foramen apical.

Figura 2e

Espécimen experimental – Tinción Rojo Sirio F3B – Contraste Tinción de Gram.

Con mayores aumentos se observa la ZRC y la ZLC. El contraste con tinción de Gram permite visualizar poblaciones microbianas organizadas como un biofilm (BF) adheridas a la superficie dentaria en zonas adyacentes al foramen apical.

Lámina 3



Leyenda de Figuras

Lámina 3

Figura 3a y 3b

Espécimen experimental: Localización inmunohistoquímica de colágeno tipo I.

Obsérvese la inmunorreacción positiva de color café en la Zona Rica en Colágeno (ZRC). La superficie radicular del ápice de la raíz y en la salida de conductos accesorios se observa negativa a la inmunotinción y corresponde a la Zona Libre de Colágeno (ZLC). Salida de conducto accesorio (flecha)

Figura 3c, 3d y 3e

Espécimen experimental: Localización inmunohistoquímica de colágeno tipo I.

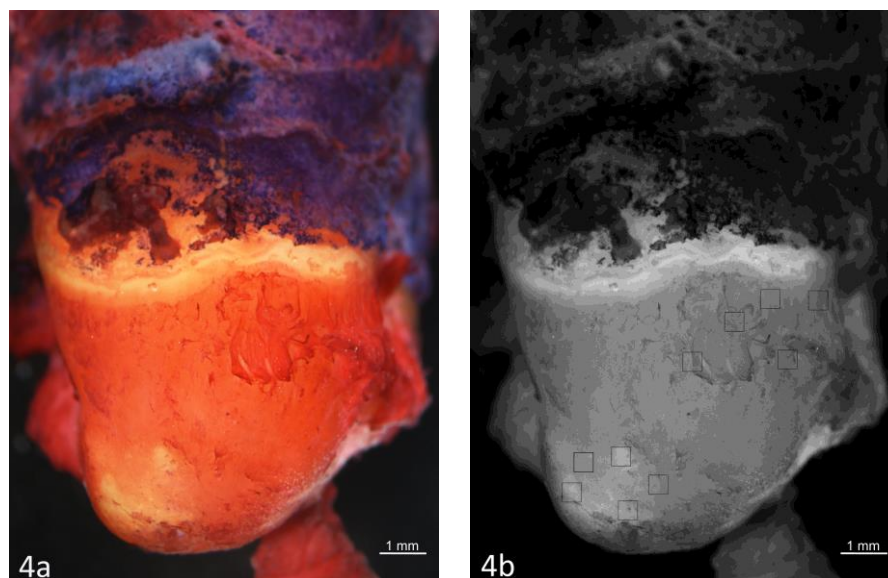
Obsérvese con mayores aumentos la inmunorreacción positiva de color café en la Zona Rica en Colágeno (ZRC). La superficie radicular del ápice de la raíz y en la salida de conductos accesorios se observa negativa a la inmunotinción y corresponde a la Zona Libre de Colágeno (ZLC). Salida de conducto accesorio (flecha)

Figura 3f

Espécimen control negativo: Localización inmunohistoquímica de colágeno tipo 1.

Se observa la raíz dentaria de un diente sano con ausencia de inmunorreacción.

Procedimiento de selección de las áreas de interés, para el estudio densitométrico.



Leyenda de Figuras

Figura 4a

Imagen microscópica de uno de los especímenes experimentales procesados para histoquímica y contrastados con Gram.

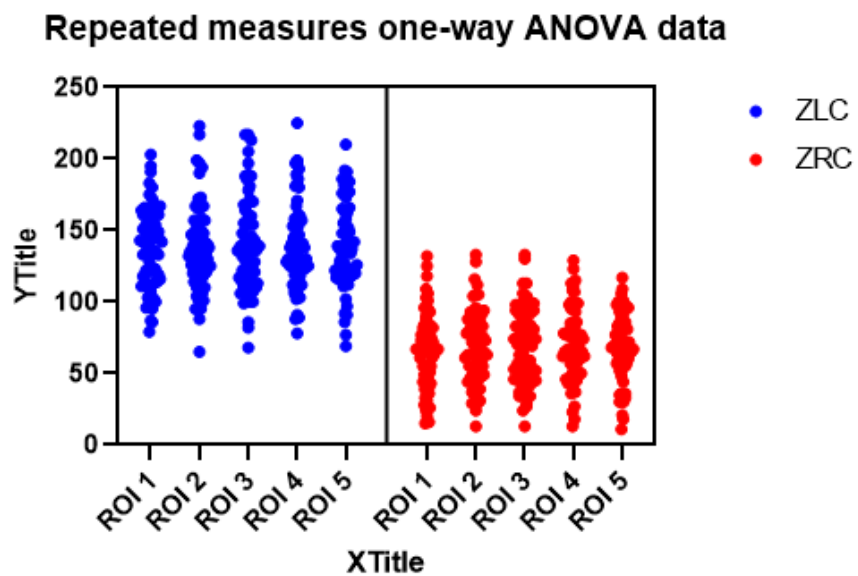
Figura 4b

Imagen mostrada en la figura 4a transformada de RGB a escala de grises, donde se muestran las 5 regiones de interés (ROI) de $200\ \mu\text{m}^2$ tanto en la ZLC y ZRC.

Figura 4c

En esta imagen se observan los histogramas de las ROI seleccionadas.

Gráfico 1.



Leyenda de Gráfico 1

Se puede observar la distribución de los datos obtenidos de las ZLC y ZRC de los 65 especímenes experimentales. En la vertical se aprecia la escala de densidad de color (escala de grises) y en la horizontal muestran las 5 regiones de interés (ROI) tanto en la ZLC y ZRC.

DISCUSIÓN

En el presente estudio de investigación se realizó un análisis histoquímico e inmunohistoquímico para estudiar la organización de las fibras del ligamento periodontal remanente de dientes extraídos por periodontitis apical de origen endodóntico.

El uso de tinciones en dientes extraídos ha sido demostrado por diversos autores como un valioso método para examinar la morfología de la superficie dentaria ⁽²⁾. Este método simple proporciona información adecuada y necesaria para explicar la patogénesis de los tejidos periodontales al minuto de hacer la extracción. Los dientes extraídos son estudiados mediante microscopía estereoscópica. Esta metodología ha permitido explicar procesos patológicos, como la formación del saco periodontal, su estructura y componentes. Sobre la superficie radicular, se ha descrito la presencia de una Zona Libre de Placa (ZLP), ubicada entre el biofilm subgingival y las fibras más coronales del ligamento periodontal. En esta ZLP se ubica el epitelio de unión en una condición *in vivo* ⁽²⁾.

Para obtener la eliminación completa del biofilm subgingival durante el tratamiento de la enfermedad periodontal, los instrumentos deben alcanzar la ZLP o extenderse apicalmente ^(2,23). Por lo tanto, el conocimiento de la morfología del saco periodontal y de la existencia de la ZLP es importante para un tratamiento periodontal adecuado. La migración apical de la ZLP involucra la pérdida de inserción y la existencia de un saco periodontal en el diente *in vivo*.

En nuestro estudio, se utilizó una tinción específica para proteínas colágenas desarrolladas por Junqueira y cols. en 1979. Esta tinción específica que utiliza el colorante Rojo Sirio F3B es una de las más empleadas por los investigadores para estudiar la organización de las matrices extracelulares ricas en fibras de colágeno en diferentes tejidos ⁽²⁴⁾. La calidad del contraste conferido por el colorante utilizado en nuestros especímenes entrega imágenes nítidas y

resolutivas de la organización del ligamento periodontal remanente. Las tinciones empleadas previamente, no entregan una definición óptima de la trama de fibras colágenas remanentes sobre las superficies dentarias después de la extracción. La ZLP fue detectada en nuestros especímenes y su morfología es similar a la observada en los estudios anteriores.

En la enfermedad periodontal se pierde el equilibrio entre el biofilm periodontal y el hospedero debido a la reacción inmune exagerada frente a la presencia microbiana, dando como resultado un estado inflamatorio que conduce al daño tisular. Esta respuesta inflamatoria crónica conduce a la reabsorción ósea alveolar mediada por osteoclastos y a la degradación de las fibras del ligamento periodontal por metaloproteinasas de la matriz ⁽²⁵⁾.

En la periodontitis apical, la inflamación y destrucción de los tejidos perirradiculares es causada por agentes etiológicos de origen endodóntico. El entorno endodóntico proporciona un hábitat selectivo para el establecimiento de una flora mixta, predominantemente anaeróbica. Esta comunidad polimicrobiana adaptada al hábitat que proporciona el conducto radicular tiene varias propiedades biológicas y patógenas, como antigenicidad, actividad mitogénica, quimiotaxis, histólisis enzimática y activación de las células del hospedero. Los microorganismos y los mecanismos defensivos del individuo encuentran, colisionan y destruyen gran parte del tejido periapical, lo que resulta en la formación de diversas lesiones apicales ⁽²⁶⁾.

Saglie y cols. en 1975 estudiaron en dientes afectados periodontalmente la morfología de zonas con fibras periodontales destruidas. La muestra experimental fue teñida con azul de bromofenol y tinción de Gram para ser examinada con un microscopio estereoscópico. En la investigación se comparó las profundidades de los sacos periodontales tanto en la clínica y en el laboratorio post extracción. Los resultados indicaron que las medidas de las profundidades de los sacos periodontales en el laboratorio eran siempre menores que las que se registraban

clínicamente. Considerando lo anterior, los investigadores establecieron una relación entre estos hallazgos y la presencia de una zona de fibras periodontales destruidas de manera total o parcial, y la razón de la discordancia en la medición podría ser que el explorador atravesó esta zona de fibras periodontales destruidas hasta un punto más resistente que está formado por las fibras periodontales apicales intactas ⁽²⁾. A diferencia del estudio mencionado anteriormente, en nuestra investigación, y gracias a las tinciones específicas que se emplearon, se pudo evidenciar con claridad las zonas de fibras periodontales remanentes y con ello la detección de fibras de colágeno tipo I. La reacción histoquímica se observó en la superficie radicular de todos los especímenes, tiñendo de color rojo intenso las zonas que presentaban ligamento periodontal remanente. Estas zonas fueron denominadas como Zonas Ricas en Colágeno (ZRC). Y en la superficie apical de la raíz, en zonas periféricas a la salida de los conductos radiculares de todos nuestros especímenes se detectaron zonas que presentaban menor o ninguna afinidad tintorial por el colorante empleado. Estas zonas se denominaron como Zona Libre de Colágeno (ZLC). Al ser contrastada la totalidad de nuestra muestra experimental con tinción de Gram, se pudo observar poblaciones microbianas adheridas y organizadas como un biofilm a la superficie apical de la raíz, en zonas periféricas a la salida de los conductos radiculares y relacionados con las ZLC. Por último, se evidenció la reacción antígeno – anticuerpo como una coloración de color café amarillento específicamente en las ZRC de las raíces dentarias. Las ZLC presentaban a la inspección visual una menor o nula afinidad por la reacción antígeno – anticuerpo.

Los resultados de esta investigación demostraron que existen diferencias significativas en la intensidad de reacción histoquímica entre las ZRC Y ZLC lo que demuestra pérdida de inserción periodontal evidente en las zonas periapicales de las raíces de dientes portadores de periodontitis apical de origen endodóntico. Esta pérdida de inserción periapical evidenciada por métodos histoquímicos e inmunohistoquímicos permitirían explicar la razón por la cual en una radiografía periapical de estos dientes en las zonas afectadas se observa primeramente un

espacio periodontal ensanchado o una lesión radiolúcida evidente. La pérdida de inserción involucraría colagenolisis en el ligamento periodontal, cemento radicular y hueso alveolar.

En el estudio observacional de Richardson y cols., se analizó el biofilm (BF) asociado a nueve raíces dentarias con periodontitis apical crónica, comparando dos protocolos clínicos y tres técnicas microscópicas. Se detectaron colonias bacterianas organizadas como BF en ocho de las nueve raíces. El BF se encontró adherido a la superficie del conducto radicular, conteniendo varios morfotipos celulares: bacilos, cocos, filamentos y espiroquetas. El BF fue más evidente en la región apical que en la región coronal. Se evidenció poblaciones celulares como neutrófilos polimorfonucleares (PMNN) encontrados en todos los tercios de las raíces, especialmente en el tercio apical, a menudo numeroso y bloqueando el lumen del foramen apical ⁽³⁾.

Las observaciones realizadas por Richardson y cols. son corroboradas en nuestro estudio ya que la tinción de Gram demostró un BF adherido a la superficie cementaria de la raíz. adyacente a la salida del conducto principal o de los conductos accesorios. Una observación importante fue que este BF se asoció con áreas en las cuales las fibras de colágeno del ligamento periodontal estaban total o parcialmente ausentes. Lo anterior significa que para el establecimiento del BF debería existir pérdida de inserción periodontal que otorgue una superficie mineralizada sobre la cual se organicen las poblaciones microbianas provenientes del conducto radicular.

Las observaciones hechas en este trabajo de investigación entregan una visión morfológica de la pérdida de inserción periodontal asociada con periodontitis apicales de origen endodóntico. La asociación de BF organizado en áreas perirradiculares permite cuestionar el rol de la terapia endodóntica convencional para el tratamiento de las periodontitis apicales.

CONCLUSIÓN

1. Existe pérdida de inserción periodontal en zonas periféricas a la salida de los conductos radiculares en dientes portadores de periodontitis apical de origen endodóntico.

BIBLIOGRAFÍA

1. MINSAL, Guía Clínica AUGE Urgencia Odontológica Ambulatoria [libro electrónico]. Chile: Subsecretaría de Salud Pública; 2011 [cited 2018 May 20].
2. Saglie R, Johansen JR, Flotra L. The zone of completely and partially destructed periodontal fibres in pathological pockets. J Clin Periodontol.1975 Mar 6;2:198-202.
3. Richardson N, Mordan NJ, Figueiredo JAP, Gulabivala K. Microflora in teeth associated with apical periodontitis: a methodological observational study comparing two protocols and three microscopy techniques. Int Endod J. 2009;42:908-921.
4. Malakar M. Cells of Periodontum. World J Pharm Pharm Sci. 2017;6:212-228.
5. Dean R. The Periodontal Ligament: Development, Anatomy and Function. J Dent Oral Health. 2017;16(6):1-7.
6. De Jong T, Bakker AD, Everts V, Smit TH. The intricate anatomy of the periodontal ligament and its development: Lessons for periodontal regeneration. Journal of Periodontal Research. 2017;52(6):965-974.
7. Arzate H, Zeichner-David M, Mercado-Celis G. Cementum proteins: role in cementogenesis, biomineralization, periodontium formation and regeneration. Periodontol 2000. 2015;67(1):211-233.
8. Yamamoto T, Hasegawa T, Yamamoto T, Hongo H, Amizuka N. Histology of human cementum: Its structure, function, and development. Japanese Dental Science Review. 2016;52(3):63-74.

9. Lafon A, Pereira B, Dufour T, Rigouby V, Giroud M, Béjot Y, et al. Periodontal disease and stroke: A meta-analysis of cohort studies. *Eur J Neurol*. 2014;21(9):1155–61.
10. Ali J, Pramod K, Tahir MA, Ansari SH. Autoimmune responses in periodontal diseases. *Autoimmun Rev*. 2011;10(7):426–31.
11. Lindhe J, Lang NP, Karring T. Periodontología Clínica e Implantología Odontológica. 5a ed. Médica Panamericana. 2009. 285–304 p.
12. Guízar-Mendoza J, LÓpez-Ayuso C, Anguiano-Flores L, Fajardo-Araujo M, Amador-Licona N. Correlation between interleukin-1 β and matrix metalloproteinase-1 levels in crevicular fluid with a proposed periodontal disease index in children. Vol. 22, *Journal of Indian Society of Periodontology*. 2018. p. 209.
13. Cardoso FGR, Ferreira NS, Martinho FC, Nascimento GG, Manhães LRC, Rocco MA, et al. Correlation between Volume of Apical Periodontitis Determined by Cone-beam Computed Tomography Analysis and Endotoxin Levels Found in Primary Root Canal Infection. *J Endod*. 2015;41(7):1015–9.
14. Fouad AF. Endodontic Microbiology and Pathobiology. *Dent Clin North Am* [Internet]. 2016;61(1):1–15.
15. Cohenca N, Amaro AMG. Root Canal Infection and Endodontic Apical Disease. In: *Desinfection of Root Canal Systems: The Treatment of Apical Periodontitis*. 2014.
16. Evans N, Hayes J. Textbook of Endodontology. 2a ed. *Int Endod J*. 2005;38(7):113–127.

17. American Association of Endodontists. Glossary of Endodontic Terms, Ninth Edition. 2016.
18. Manjunatha B, Agrawal A, Shah V. Histopathological evaluation of collagen fibers using picrosirius red stain and polarizing microscopy in oral squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Ther*. 2016;11(2):272.
19. Lattouf R, Younes R, Lutomski D, Naaman N, Godeau G, Senni K, et al. Picrosirius Red Staining: A Useful Tool to Appraise Collagen Networks in Normal and Pathological Tissues. *J Histochem Cytochem*. 2014;62(10):751–8.
20. Dapson RW, Fagan C, Kiernan JA, Wickersham TW. Certification procedures for sirius red F3B (CI 35780, Direct red 80). *Biotech Histochem*. 2011;86(3):133–9.
21. Suppa P, Ruggeri A, Toy FR, Prati C, Biasotto M, Falconi M, et al. Reduced antigenicity of type I collagen and proteoglycans in sclerotic dentin. *J Dent Res*. 2006;85(2):133–7.
22. Cepeda-Valdés R, Pohla-Gubo G, Borbolla-Escoboza JR, Barboza-Quintana O, Ancer-Rodríguez J, Hintner H, et al. Mapeo por inmunofluorescencia para el diagnóstico de epidermólisis ampollosa congénita. *Actas Dermosifiliogr*. 2010;101(8):673–82.
23. Waerhaug J. Periodontal problems on extracted teeth. *J Clin Period*. 1975.
24. Junqueira LCU, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J*. 1979;11(4):447–55.

25. Kinane DF, Stathopoulou PG, Papapanou PN. Periodontal diseases [Internet]. Vol. 3, Nature Reviews Disease Primers. Macmillan Publishers Limited; 2017. p. 1–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrdp.2017.38>
26. Nair PN. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. 2004;15(6):348–81.

ANEXO

Resolución Comité Ético Científico, Universidad Finis Terrae.



RESOLUCIÓN N°10/2019

Santiago, 2 de octubre de 2019

Vistos, y considerando la revisión a cargo de los miembros del Comité Ético Científico de la Universidad Finis Terrae, del proyecto titulado **"Determinación Inmunomorfológica de la pérdida de inserción periodontal en dientes con periodontitis apical"** de autoría de D. Paulina Adasme Ossandón y D. Fabián Ramírez Barros, se resuelve una resolución aprobatoria para la solicitud de Dispensa de Consentimiento informado y para la ejecución del proyecto.

Esta resolución tiene la vigencia de un año. Para extender esta aprobación, la Investigadora Responsable deberá solicitar al Comité Ético Científico su renovación.

Atentamente,

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Pilar Busquets Losada'.

Pilar Busquets Losada
Presidente Comité Ético-Científico
Universidad Finis Terrae



